

- Хропова В. И., Мухаммадиев Б. Эффект фидерства у одноклеточной водоросли хлореллы, связанный с выделением в среду аргининсодержащих пептидов. — Вестн. Ленингр. ун-та, 1970, № 15, с. 133—142.
- Шеришорина С. И. Выявление авизуальных форм микробов в бактериофагных лизатах методом «кормилок». — Вестн. микроб. эпид., 1936, т. 15, № 3—4, с. 293—300.
- Chodat R. La mutation generalisée et les mutations chez le *Chlorella rubescens* Chod. — Compte Rend. Séances Sos. phys. et histor. natur. Genève, 1929, vol. 46, n° 1, p. 31—38.
- Davis E. A. Photosynthetic studies with mutant strains of *Chlorella*. — Science, 1948, vol. 108, No 2796, p. 110—111.
- Desize M. Eny. Amino acids in healthy *Chlorella* cells. — J. bacteriol., 1949, vol. 58, No 2, p. 269—270.
- Fowden L. A comparison of the compositions of some algae proteins. — Ann. bot., N. S., 1954, No 18, (1), p. 257.
- Granick S. Protoporphyrin 9 as a precursor of Chlorophyll. — J. biol. chem., 1948, vol. 172, No 2, p. 717—727.
- Kanasa wa T. Changes of amino acid composition of *Chlorella* cells. during their life cycle. — Plant and cell physiol., 1964, vol. 5, No 3, p. 333—354.
- Schwarze P. V. Fradsen N. O. Herstellung von *Chlorella*-Farbmutanten mit Hilfe von radiaktiven Isotopen. — Naturwiss., 1960, vol. 47, Hft. 2, S. 47.
- Shigero Uda ka. Screening method for microorganisms accumulating metabolites and its use in the isolation of *Micrococcus glutamicus*. — J. bacteriol., 1960, vol. 79, No 5, p. 754—755.

О МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ ОТБОРА В МИКРОБНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ ПРОТОЧНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Н. С. Печуркин, И. А. Терсков

Кафедра генетики и селекции ЛГУ и Институт физики СО АН СССР

Одной из существенных характеристик непрерывной культуры микроорганизмов является смена большого числа поколений микроорганизмов. Наличие большого числа генераций в популяции в стабилизированных условиях протока позволяет поставить задачу детального изучения эволюции развития гетерогенной популяции, количественно оценить направление и скорость популяционных изменений. Следует отметить, что генетические перестройки в микробной популяции определяются как ее генным составом, так и условиями культивирования, т. е., в частности, зависят от обеспеченности популяции питательными веществами. При проточном культивировании микроорганизмов различают два основных типа режимов: процессы с внешним лимитированием по питанию и с поддержанием постоянной скорости протока (типа хемостата), процессы с поддержанием постоянной концентрации биомассы без внешнего лимитирования (типа турбидостата) (Малек и Фенцл, 1968).

Настоящая работа посвящена сравнительному анализу хемостатного и турбидостатного режимов с точки зрения генетической перестройки и направления действия отбора в микробных популяциях на протоке. Теоретические исследования проведены с использованием детерминистских моделей процессов на основе дифференциальных уравнений. Применение подобных математических моделей для изучения задач динамики развития микробных популяций на протоке может быть оправдано тем, что, идя на некоторое упрощение деталей реального процесса, можно получить достаточно общие количественные закономерности микроэволюции в популяции. Кроме того, одним из серьезных преимуществ такого подхода является возможность экспериментальной проверки расчетных данных, полученных на модели, и исполь-

зование такой модели в качестве рабочего инструмента в экспериментальных исследованиях.

Поведение бактериальной популяции в хемостате с учетом мутаций и отбора теоретически рассмотрено в работе Мозера (Moser, 1958). Изучая динамику концентрации мутантов различных типов в хемостате с помощью математической модели, основанной на дифференциальных уравнениях, Мозер определил, что в популяции микроорганизмов имеется целый спектр мутантов, концентрации которых находятся на низких равновесных уровнях. Скорость роста этих мутантов ниже, чем скорость роста исходной формы популяции.

Помимо спектра медленно растущих мутантов, в культуре может образоваться мутант, растущий быстрее исходной формы в данных условиях. В популяции на протоке такой мутант вытесняет исходную форму из ферментера. Чем больше разница в удельных скоростях роста, тем быстрее происходит вытеснение, тем эффективнее отбор в пользу мутанта. Давление отбора (σ) Мозер характеризует как разницу в удельных скоростях роста мутантного и исходного штаммов:

$$\sigma = \mu_m - \mu_i. \quad (1)$$

Удельная скорость роста микроорганизма в хемостате в существенной степени определяется концентрацией лимитирующего рост элемента питания. С хорошей степенью приближения экспериментальным зависимостям $\mu = \mu(S)$ соответствует формула Моно (Малек и Фенцл, 1968). Для исходного и мутантного штаммов эта формула имеет вид:

$$\mu_m = \frac{\mu_{m \max} \cdot S}{K_{sm} + S}, \quad (2a)$$

$$\mu_i = \frac{\mu_{i \max} \cdot S}{K_{si} + S}, \quad (2b)$$

где μ_m , μ_i — реальные удельные скорости роста мутантной и исходной форм в хемостате; $\mu_{m \max}$, $\mu_{i \max}$ — максимальные удельные скорости роста этих же форм, соответственно; K_{sm} , K_{si} — константы Михаэлиса для обоих штаммов, численно равные концентрациям субстрата S , при которой скорость роста штамма достигает половины максимальной.

Так как в хемостате концентрация лимитирующего рост фактора устанавливается на низком уровне, то наибольший вклад в величину удельной скорости роста дает константа Михаэлиса, поэтому отбор в хемостате идет на уменьшение именно этой константы, а не максимальной скорости роста. Экспериментальные данные хорошо подтверждают эту особенность хемостата (Novick a. Scillard, 1950). На рис. 1 показан характер зависимости удельной скорости роста двух штаммов *Escherichia coli* в хемостате при лимитировании роста триптофаном. При низких концентрациях триптофана эффективная скорость роста «быстрого» мутанта может в несколько раз превышать скорость роста «медленного» штамма, что приводит к быстрому вытеснению исходного «медленного» штамма. Отметим, что максимальные скорости роста у обоих штаммов одинаковы. Мутантный штамм с высокой ростовой активностью при низких концентрациях субстрата способен расти со скоростью, равной скорости протока (основное условие стационарного состояния), при меньших концентрациях субстрата. Следовательно, такое замещение штаммов приводит к снижению действующей концентрации лимитирующего вещества или к более полной его утилизации. Общая картина изменения состояния хемостатной культуры при автоселекции штаммов, т. е. генетической перестройки популяции с применением расчетов Мозера к экспериментальным данным Новика и Сциларда (Мо-

рег, 1958) показана на рис. 2. Исходный штамм *E. coli* B1/t замещается мутантом B1/tλ, который обладает более высокой скоростью роста при лимитировании триптофаном (т.е. с более низкой константой Михаэлиса, чем штамм B1/t). Цифра I на рис. 2 соответствует графику изменения концентрации исходного штамма X_i и мутантного X_m . Цифрой II отмечена кривая изменения концентрации триптофана, лимитирующего рост фактора. Цифра III соответствует кривым изменения удельных скоростей роста в течение процесса замещения. Цифра IV обозначает область изменения суммарной плотности популяции. Таким образом, анализ типичной картины замещения штаммов в хемостате показывает, что при этом концентрация лимитирующего рост субстрата понижается, общая скорость роста популяции остается на прежнем уровне, суммарная концентрация биомассы популяции возрастает за счет более полной утилизации субстрата. Такое превращение штаммов может происходить неоднократно. Основная тенденция популяционных изменений—более полная утилизация субстрата без изменения общей скорости роста при небольшом увеличении концентрации биомассы. Подобные эксперименты доказывают большую способность бактериальной

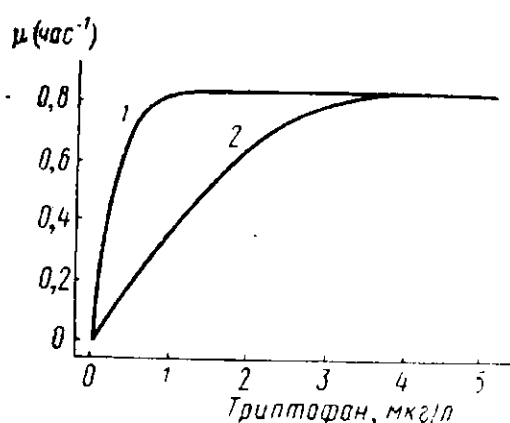


Рис. 1. Зависимость удельной скорости роста двух триптофан-зависимых мутантов *Escherichia coli* от концентрации триптофана в хемостате (Moser, 1958).

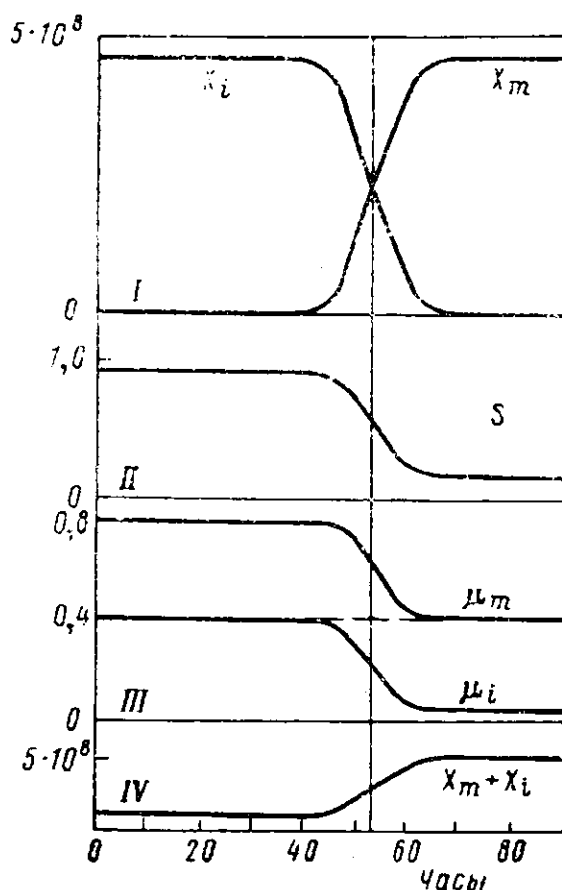


Рис. 2. Общая картина перестройки популяции *Escherichia coli* в хемостате (Moser, 1958).

культуры приспосабливаться к специфическим условиям хемостата. С точки зрения устойчивости непрерывной культуры в хемостате, можно отметить, что культура не вырождается, общий рост популяции не затухает со временем, а генетические перестройки направлены на увеличение приспособленности к условиям хемостата.

Условия роста культуры в турбидостате отличаются от хемостатных прежде всего тем, что в турбидостате при нелимитирующих средах рост культуры может происходить со скоростями, близкими к максимальным. На языке математической модели это означает, что в режимах типа турбидостата должен происходить отбор в пользу мутанта с увеличенной максимальной скоростью роста (μ_{\max}), в то время как в хемостате отбор идет, в основном, на уменьшение константы Михаэлиса. Другой отличительной чертой турбидостата является постоянство концентрации биомассы, и поэтому процесс замещения штаммов в таком режиме должен приводить к увеличению суммарной скорости роста популяции, а с ней и скорости потока.

Основная система уравнений для турбидостатного режима имеет вид (Печуркин, 1969; Pechurkin, 1969):

$$\begin{aligned}\frac{dx_i}{dt} &= \left(\mu_i - \mu_m - \frac{K_i \cdot \mu_i}{\ln 2} \right) \cdot x_i - (\mu_i - \mu_m) \cdot \frac{x_i^2}{x_T}, \\ \frac{dx_m}{dt} &= (\mu_m - \mu_i) \cdot x_m - (\mu_m - \mu_i) \cdot \frac{x_m^2}{x_T} + \frac{K_m \cdot \mu_i}{\ln 2} \cdot x_i,\end{aligned}\quad (3)$$

где x_i , x_m — концентрация биомассы, или число клеток в единице объема исходной и мутантной форм, соответственно; $x_T = x_i + x_m$, μ_i , μ_m — удельные скорости роста исходной и мутантной форм, соответственно; $K_i \mu_i / \ln 2$ — скорость мутирования исходной формы в единицу времени; K_i — частота мутирования исходной формы на одно поколение; $K_m \mu_i / \ln 2$ — скорость образования мутантной формы в единицу времени; K_m — частота образования данного мутанта с удельной скоростью роста μ_m на одно поколение исходной формы. Поскольку, как правило, образуется целый спектр мутантов с различными скоростями роста, то общая частота мутирования исходной формы равна сумме частот образования всех мутантов, т. е.

$$K_i = \sum_{j=1}^N K_{mj},$$

или

$$K_{mj} = P_{mj} \cdot K_i; \quad \sum_{j=1}^N P_{mj} = 1,$$

где P_{mj} — вероятность образования мутантов с удельной скоростью роста μ_{mj} , N — число всех типов мутантов, различных по скорости роста.

С использованием условия постоянства общей концентрации биомассы, после перехода к относительному времени через количество генераций исходной формы, получено аналитическое выражение для динамики концентрации мутанта в популяции:

$$x_m = x_T \frac{\left(x_{m0} + \frac{x_T \cdot K_m}{\ln 2 \cdot \sigma_n} \right) \cdot e^{\delta_n \cdot n} - x_{i0} \cdot \frac{K_m}{\ln 2 \cdot \sigma_n}}{x_{i0} + \left(x_{m0} + \frac{x_T \cdot K_m}{\ln 2 \cdot \sigma_n} \right) \cdot e^{\delta_n \cdot n}}, \quad (4)$$

где x_T — общая концентрация биомассы популяции;

$$\begin{aligned}\delta_n &= \left(\frac{\mu_m}{\mu_i} - 1 + \frac{K_i}{\ln 2} \right) \cdot \ln 2; \\ \sigma_n &= \left(\frac{\mu_m}{\mu_i} - 1 \right) \cdot \ln 2; \quad \sigma_n > 0;\end{aligned}$$

n — число генераций исходной формы.

Основной отличительной чертой процесса автоселекции в турбидостате является изменение средней скорости роста популяции, а следовательно, и скорости потока D (Печуркин, 1969):

$$\mu_T = D = \mu_i + (\mu_m - \mu_i) \left[1 - \frac{1}{1 + \frac{x_{m0}}{x_{i0}} \cdot e^{\delta_n \cdot n} + \frac{K_m}{\ln 2 \cdot \sigma_n} (e^{\delta_n \cdot n} - 1)} \right]. \quad (5)$$

Анализ формулы (5) показывает, что при малом начальном количестве мутанта в популяции, при $x_m \ll x_i$, $\mu_T = D \simeq \mu_i$, т. е. суммарная удельная скорость роста определяется скоростью роста исходного штамма.

В другом предельном случае, при $x_m \gg x_i$, когда процесс замещения исходной культуры мутантным штаммом практически закончен, $\mu_t = D \sim \mu_m$, т.е. общая скорость роста популяции определяется скоростью роста мутантного штамма.

В экспериментальных исследованиях процесса автоселекции в качестве объекта использовалась культура дрожжей *Candida tropicalis* шт. Т-20, способная использовать углеводороды в качестве источника энергии и углерода. Эксперименты проводились на установке «Биостенд» с управлением скоростью потока по скорости изменения рН культуры на нелимитирующих рост питательных средах в режиме типа турбидостата — рН-стате (Печуркин и др., 1969).

Согласно теоретическому анализу (см., например, (4)) автоселекция по скорости роста зависит от размеров популяции, разницы в скоростях роста исходного и мутантного штаммов, а также общей частоты мутирования и скорости образования данного мутанта. В экспериментах по автоселекции размеры исходной популяции могут быть достаточно большими. Частота образования мутанта с повышенной скоростью роста, естественно, намного ниже общей частоты мутирования. Повысить вероятность образования мутантов подобного рода можно с помощью применения мутагенов различной природы. В первых экспериментах по автоселекции продолжительностью до 100 генераций исходной культуры, без применения мутагенов, не было получено повышения удельной скорости роста популяции, которая удерживалась на уровне $(0,12—0,13) \text{ ч}^{-1}$ при концентрации биомассы $x = (5,5—6,0) \text{ г/л}$; температуре $35,5^\circ \text{C} \pm 0,5$; $\text{pH} = 4,1 \pm 0,1$.

Контроль за чистотой и изменением исходной культуры осуществлялся путем ежедневных высевов проб из культиватора на чашки Петри с агаризованной средой Ридер и парафином.

Так как замещения штаммов при естественной частоте мутаций не произошло, то в дальнейшем были использованы мутагены для увеличения вероятности образования «редких» мутантов с повышенной скоростью роста, в частности этиленимин. В результате воздействия мутагена выживаемость была близка к 100% (по контролю на чашках). Клетки, подвергшиеся действию этиленимина, после отмывания выращивали на качалках на среде Ридер в течение 4 суток и в ферментере без протока около 20 ч. Затем было начато непрерывное культивирование рН-статным способом. Все параметры процесса поддерживались на тех же уровнях, что и в предыдущих опытах без воздействия мутагеном.

Удельная скорость роста непрерывной культуры по-прежнему устанавливалась на уровне $0,12 \text{ ч}^{-1}$, характерном для данного штамма в данных условиях культивирования. Однако на 5-е сутки непрерывного культивирования (9-е от начала опыта) суммарная удельная скорость роста резко увеличилась, к шестым суткам достигла величины $0,18 \text{ ч}^{-1}$ и на этом уровне застabilizировалась в течение не менее 7 последующих суток. Этот скачок в скорости роста сопровождался появлением на чашках колоний дрожжей новой морфологии. Колонии исходной формы (шт. Т-20) характеризовались радиальной складчатостью и ярко выраженным центром — точкой, кружком или валиком, в зависимости от возраста колонии. Колонии новой формы были плоскими и гладкими с легкой радиальной складчатостью, появляющейся с возрастом лишь по краям колоний.

Таким образом, в результате процесса автоселекции удельная скорость роста возросла в 1,5 раза. Для расчета по формулам (4) и (5) использовались параметры, взятые из эксперимента: $\mu_i = 0,118 \text{ ч}^{-1}$; $\mu_m = 0,18 \text{ ч}^{-1}$; $\delta = 0,062 \text{ ч}^{-1}$. Частота спонтанного мутирования, определяемая по морфологическим изменениям колоний на чашках, дости-

гала величины $4 \cdot 10^{-4}$, под влиянием мутагена она увеличилась до $2 \cdot 10^{-3}$. Мутантных форм, растущих быстрее исходной, при посевах на чашки обнаружено не было из-за низкой частоты их возникновения и трудности уверенной идентификации с помощью чашек.

На рис. 3 показана общая картина автоселекции в режиме с постоянной концентрацией биомассы по результатам проведенного теоретического и экспериментального исследования. Хорошее совпадение расчета и эксперимента соответствует начальному отношению $x_{m0}/x_{i0} = 5 \cdot 10^{-7}$, а процентное отношение доли положительных по скорости

роста мутаций к общему числу мутаций, образовавшихся в результате действия мутагена, равно $K_{m0}/K_{i0} = 0,025\%$.

Область I рис. 3 соответствует изменениям концентрации исходной и мутантной форм. Вытеснение исходной формы мутантом сопровождается скачкообразным изменением скорости потока, равной средней удельной скорости роста популяции (область III.). При этом суммарная концентрация биомассы популяции поддерживается на постоянном уровне согласно условиям турбидостата (область II). Таким образом, отбор штаммов в турбидостате приводит к увеличению продуктивности непрерывной культуры (P) через увеличение скорости роста при заданной концентрации биомассы:

$$P = \mu_T \cdot x_T, \quad x_T = \text{const},$$

что представляет несомненный интерес не только с теоретической, но и с практической стороны, особенно для промышленной микробиологии.

Таким образом, проведенный анализ дает возможность в общих

чертах получить достаточно полное количественное описание процесса генетической перестройки в микробной популяции в двух основных режимах непрерывного культивирования, оценить их сходства и различия. Для дальнейшего углубления этого описания необходимо учитывать взаимодействие штаммов в популяции, ингибирование роста продуктами метаболизма при сложных ферментациях, статистический характер появления мутантов и пр.

В заключение можно отметить, что метод непрерывного культивирования является достаточно чувствительным и тонким инструментом для выделения перспективных по скорости роста штаммов в результате незатухающего со временем действия отбора. Гарантия успеха заложена в правильном применении этого инструмента.

Summary

The quantitative description of the process of genetical reconstruction of microbial population was given for two basic types of continuous cultivation: the chemostatic and turbidostatic ones. The autoselection in turbidostat results in a productivity increase through the higher speed of growth of the select microbial strain. The theoretical and applied aspects of this phenomenon was discussed.

ЛИТЕРАТУРА

- Непрерывное культивирование микроорганизмов. Под ред. И. Малека, З. Фенц-ла. М., 1968. 475 с.
- Печуркин Н. С. Автоселекция мутанта, растущего быстрее исходной формы при непрерывном культивировании микроорганизмов. — В кн.: Биология и культивирование микроорганизмов. Красноярск, 1969, с. 106.
- Печуркин Н. С., Позмогова И. Н., Терсков И. А. Регулирование процесса непрерывного культивирования *Candida tropicalis* изменением pH среды. — «Прикладная биохимия и микробиология», 1969, № 5(2), с. 158—163.
- Moser H. The dynamics of bacterial populations maintained in the chemostate. Washington, 1958.
- Novick A., Szilard L. Experiments with chemostate on spontaneous mutations of bacteria. — Proc. nat. acad. sci. USA, 1950, vol. 36, 708 p.
- Pechurkin N. S. Continuous cultivation of microorganisms as a means of their auto-selection by growth rate in set condition. — In: Continuous cultivation of microorganisms. Prague, 1969, 315 p.
-